



TITLE:

Werner症候群におけるインスリン
作用障害の研究(Dissertation_全文
)

AUTHOR(S):

山田, 和範

CITATION:

山田, 和範. Werner症候群におけるインスリン作用障害の研究. 京都大学, 1992, 博士(医学)

ISSUE DATE:

1992-07-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3062617>

RIGHT:

W e r n e r 症候群における
インスリン作用障害の研究

山 田 和 範

2

Werner症候群におけるインスリン作用障害の研究

(1) 培養皮膚線維芽細胞のインスリン結合の変化

京都大学医学部第2内科

山 田 和 範

葛 谷 英 嗣

井 村 裕 夫

別冊請求

京都市左京区聖護院川原町54

京都大学医学部第2内科

山 田 和 範

Studies on Insulin Resistance in Werner's Syndrome
(1) Changes in Insulin Binding to Cultured Fibroblasts

Kazunori Yamada, Hideshi Kuzuya, and Hiroo Imura

Second Department of Internal Medicine,
Faculty of Medicine, Kyoto University

Key Words: cultured fibroblasts
genetic defect of insulin action
insulin receptor
insulin resistance with aging
Werner's syndrome

抄 録

早期老化を特徴とする常染色体性劣性遺伝疾患であるWerner症候群では高頻度にインスリン抵抗症を認める。これがインスリン受容体の何らかの先天性な異常に基くものか否かをみるために、11名の患者から得た培養皮膚線維芽細胞へのインスリン結合を調べた。その結果Werner症候群の細胞ではin vitroでのageをマッチさせた正常者の細胞に比し、細胞当りのインスリン結合が増加していた。しかし蛋白量当りであらわしたインスリン結合はむしろ低下していた。インスリン結合曲線のScatchard解析で、Werner症候群ではインスリン受容体数の増加と結合親和性の低下を認めた。Werner症候群では実験時の細胞蛋白量は増加し、confluent cell densityは低下しており、細胞が大きくなっていることが示された。このため細胞当りのインスリン結合が増加したものと考えられた。

つぎに、正常者から得た線維芽細胞を継代培養し、3~6CPD(cell population doubling)毎にインスリン結合を調べ、in vitroでの細胞加齢に伴うインスリン結合の変化を調べた。細胞は加齢とともに大きくなり、細胞当りのインスリン結合は増加した。老化した細胞のインスリン結合曲線はWerner症候群の細胞と同様、受容体数の増加と結合親和性の低下を示した。

以上の結果より、Werner症候群の患者の培養皮膚線維芽細胞にみられるインスリン結合の異常は、インスリン受容体の先天性な異常に基くというより、in vitroでの細胞の早期老化に基く変化である可能性が示唆された。

Summary

We studied insulin binding to cultured skin fibroblasts from 11 patients with Werner's syndrome to see if there is any primary defect of insulin receptor. The insulin binding (per cell) was increased in Werner's syndrome compared with in vitro age-matched control cells from healthy subjects. Scatchard analysis of the binding curve revealed increased binding sites with decreased binding affinity. Determination of cellular protein content and confluent cell density in culture indicated an increase in the cell size in Werner's cells compared with in vitro age-matched control cells, which well explains the increased binding in the former. Fibroblast strains from 8 normal subjects were sequentially passaged and insulin binding was determined in each strain with an interval of 3-6 CPDs. With in vitro aging the cell increased in size, accompanied by an increase in insulin binding. Insulin binding curve of old passage cells showed an increase in binding sites with a decrease in the binding affinity as found in Werner's cells. These results suggest that abnormal insulin binding in Werner's cells may be due to premature cell aging in vitro rather than genetic defects of insulin receptors.

はじめに

Werner症候群は早期老化を特徴とする常染色体劣性遺伝疾患である。高頻度に耐糖能異常を伴い、これはインスリン作用の障害に基くものと考えられている^{1)~3)}。このインスリン作用障害がいかなる機序によって起こるものかはまだ明らかではない。一般に自然老化においてもインスリンの作用障害がおこることが知られているが⁴⁾⁵⁾、Werner症候群におけるインスリン作用障害もこれと本質的に同じものであるのか、あるいはインスリン作用機構のどこかに、先天性な異常が存在しているのかなど、その成因に興味をもたれるところである。

そこで、本研究ではWerner症候群の患者から得た培養皮膚線維芽細胞を用いてインスリン受容体の異常の有無について検討を行った。インスリン受容体はin vivoでは種々の環境因子によって、その数やインスリン結合親和性が変化する。培養皮膚線維芽細胞ではこのような環境因子による二次的な変化を取り除いた状態でインスリン結合を検索することができることから、インスリン受容体の先天性な異常の検索に用いられている⁶⁾⁷⁾。

対象と方法

Werner症候群の患者11名(年齢32~52歳)を対象とした。Werner症候群の診断は白髪・禿頭などの早老性顔貌、白内障、皮膚の萎縮や硬化などの特徴的な臨床症状に基いた。ブドウ糖負荷試験では4名が正常で残る7名は糖尿病であった。対照コントロールは12名の健常人で、これらは年齢により若年者群(NY、n=7、年齢26~40歳)、老年者群(NO、n=5、年齢70~82歳)にわけた。

前腕よりバイオプシーによって得た皮膚切片を10% FCS 添加 α MEM を用いて培養した。細胞が最初のconfluenceに達した時を1st cell population doubling (CPD) とした。confluenceに達した細胞は1:8 (early passageの細胞) あるいは1:4~1:2 (late passageの細胞及びWerner症候群の細胞) に分けサブカルチャーした。1:8にサブカルチャーした細胞が、1週間以内にconfluenceに達しなくなった時をsenescent phaseの始まりとし、以後は1:4サブカルチャーを行った。

^{125}I -インスリンの培養皮膚線維芽細胞への結合は単層培養のままのBaldwinらの方法⁶⁾に準じて行った。すなわち60×15mmのculture dishを用いて、細胞がconfluenceに達して1～2日後、 ^{125}I -インスリン(0.5ng/ml)及び種々の濃度(0～100 $\mu\text{g/ml}$)の非標識インスリンと16℃で3時間インキュベートした。緩衝液には25mM Hepes、25mM Tricine、1% BSAを含む α -MEM (pH7.4)を用いた。その後、細胞を緩衝液で洗浄し1N-NaOHで可溶化して、その放射活性を γ カウンターにて測定した。インスリン100 $\mu\text{g/ml}$ 存在下における ^{125}I -インスリン結合をnonspecific bindingとした。

細胞数はhemocytometerを用いて測定し、蛋白の定量はBio-Rad protein assay kit でBSA をスタンダードとして行った。 ^{125}I -インスリンはchloramine T法を用いて作製し、比活性140～200 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ のものをを用いた。全てのデータはmean±SEであらわし、Student's *t*-testを用いて有意性を検定した。

結 果

細胞増殖：培養皮膚線維芽細胞のin vitroにおけるlife spanはWerner症候群において著しく低下していた(Table 1)。すなわちcell population doubling (CPD)の数でlife spanをあらわすと、Werner症候群では 14.5 ± 1.3 CPD、正常若年者 41.1 ± 1.3 CPD、老年者 37.6 ± 1.2 CPDと、Werner症候群の細胞では正常コントロール群に比し有意に低い値を示した($p < 0.001$)。正常若年者と老年者間には有意差はなかった。インスリン結合実験を行った時点(5～15CPD)でのcell density はWerner症候群ではコントロールの約半分に低下していた。逆に、細胞の蛋白量は増加していた($p < 0.01$)。このようにWerner症候群から得た細胞の体積は、正常コントロールの細胞に比し、大であることが明らかとなった。

インスリン結合：各群5～15CPDの細胞を用いてインスリン結合を比較した。Fig. 1に最大インスリン結合(非標識インスリン無添加における ^{125}I -インスリンの結合)とID₅₀(最大結合を50% 抑制するインスリン濃度)を示した。コントロール群では若年者から得た細胞も老年者から得た細胞も、インスリン結合に差はなかった。一方Werner症候群では異常を認めた。すなわち細胞10⁶個当りのインスリン結合はコントロールに比し増加して

いた($p < 0.001$)。しかし細胞の大きさの違いを考慮してインスリン結合を蛋白量当りであらわすと、Werner症候群ではコントロールに比しむしろ低下の傾向を示した。インスリン結合曲線からID₅₀を求めるとWerner症候群では高値で($p < 0.01$)、インスリン受容体の結合親和性の低下が示された。事実Scatchard解析(Fig. 2)でもWerner症候群の線維芽細胞では受容体数の増加(細胞当り及び蛋白量当り)と結合親和性の低下を認めた。

in vitroの加齢に伴うインスリン結合の変化：正常若年者(年齢 31.3 ± 1.9 歳)と高齢者(75.8 ± 2.8 歳)から得た培養皮膚線維芽細胞(各々4 strains)を継代培養し、経時的に(3～6 CPD毎)インスリン結合を測定してin vitroの加齢に伴うインスリン結合の変化を検討した。それぞれの細胞系においてsenescent phase に入る前の細胞をearly passage group(若い細胞)、senescent phaseに入ってからをlate passage group(老化した細胞)とすると、若年者から得た細胞も老年者から得た細胞もlate passage groupではcell densityは減少し、細胞あたりの蛋白量は増加していた(Table 3)。インスリン結合を同一の細胞系でearly passageとlate passageで比較すると、Fig. 2 に示す如く、細胞の老化に伴い細胞当りのインスリン結合は増加し、蛋白量当りのインスリン結合は減少した。またID₅₀は増加した。この点は若年者及び高齢者いずれから得た細胞系においても同様であった。

考 察

正常人から得た線維芽細胞では、若年者からのものでも老年者のものでも、インスリン結合に差はなかった。一方Werner症候群の細胞では、in vitro ageをマッチさせた(すなわちCPDをマッチさせた)コントロール細胞と比較して次の2点で相違していた。すなわち、(1) ^{125}I -インスリン結合は細胞当りであらわすと増加していたが、蛋白量当りではむしろ低下していた、(2)インスリン結合曲線のScatchard解析で細胞当りあるいは蛋白量当りのインスリン受容体数は増加し、インスリン結合親和性は低下していた。

培養皮膚線維芽細胞はインスリン作用を細胞レベルで検討する際、しばしば用いられるが、生体から採取した血液細胞や脂肪細胞を用いる場合と異なり、培養細胞はin vivoにおける種々の環境因子による変化を除外できるという点で、先天的なインスリン作用機構

の異常を検索するのに有用な材料と考えられている。今回の結果で細胞当りでみた時のインスリン結合の増加、あるいは受容体数の増加はWerner症候群ではコントロールに比し細胞が大きくなっていることによるものと考えられる。一方インスリン結合親和性の低下は、インスリン受容体に先天的な異常が存在し、それがWerner症候群に伴うインスリン作用障害の原因となっているか、もしくは細胞の成分の異常により二次的に結合親和性が変化した可能性が考えられる。

そこでこの点をさらに追求するため、正常人から得た細胞を継代培養しインスリン結合がin vitroでの細胞の老化に伴いどのように変化していくかを調べた。若年者から得た細胞系においても、老年者から得た細胞系においても、25CPDをこえると細胞増殖は低下した。同一の細胞系で25CPDまでのいわゆる若い細胞と25CPDをこえた老化した細胞を比較すると、後者ではconfluenceに達した時のcell densityの低下と細胞当りの蛋白量の増加を認め、細胞が大きくなっていることが示された。この点はWerner症候群から得た細胞と類似しているといえる。in vitroでのlife spanが著しく短縮しているWerner症候群の細胞では5~15CPDで既に、同じCPDの正常対照の細胞と比較して大きくなっていた。このような形態学的変化とともに、インスリン結合も、若い細胞と老化した細胞では差が認められた。即ちWerner症候群の細胞と同様に、in vitroで老化させた細胞では細胞当りのインスリン結合は増加し蛋白量当りでは低下していた。またインスリン受容体の結合親和性の低下が認められた。

以上の結果からWerner症候群の培養皮膚線維芽細胞におけるインスリン結合の異常はインスリン受容体の遺伝的異常によると考えるより、細胞の老化に伴う二次的な変化と考えた方が妥当であろう。この点を明らかにするため今後、赤血球などの血液細胞やEBウイルスによって形質転換した培養Bリンパ球を用いてインスリン受容体の検索を行う予定である。さらにWerner症候群の細胞や老化した細胞におけるインスリン受容体の結合親和性の低下が受容体自身の変化に基くものか、あるいは他の原因（たとえばtype I insulin like growth factor受容体の増加など）に基くものかも検討する必要がある。

文 献

- 1) Thannhauser, S.J.: Werner's syndrome (progeria of the adult) and Rothmund's syndrome: Two types of closely related heredo-familial atrophic dermatose with juvenile cataracts and endocrine features; A critical study with five new cases. *Ann. Intern. Med.*, 23, 559-626 (1945).
- 2) Epstein, C.J., Martin, G.M., Schultz, A.L. and Motulsky, A.G.: Werner's syndrome. A review of its symptomatology, natural history, pathologic features, genetics and relationship to the natural aging process. *Medicine*, 45, 177-221 (1966).
- 3) Imura, H., Nakao, Y., Kuzuya, H., Okamoto, M., Okamoto, M. and Yamada, K.: Clinical, endocrine and metabolic aspects of the Werner syndrome compared with those of normal aging. *Werner's syndrome and Human Aging*, ed by Salk, D. et al. Plenum Publishing Co. (1985).
- 4) Fink, R.I., Kolterman, O.G., Griffin, J. and Olefsky, J.M.: Mechanisms of insulin resistance in aging. *J. Clin. Invest.*, 71, 1523-1535 (1983).
- 5) Rowe, J.W., Minaker, K.L., Pallotta, J.A. and Flier, J.S.: Characterization of the insulin resistance of aging. *J. Clin. Invest.*, 71, 1581-1587 (1983).
- 6) Schilling, E.E., Rechler, M.M., Grunfeld, C. and Rosenberg, A.M.: Primary defect of insulin receptors in skin fibroblasts cultured from an infant with leprechaunism and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76, 5877-5881 (1979).
- 7) Podskalny, J.M. and Kahn, C.R.: Cell culture studies on patients with extreme insulin resistance. 1. Receptor defects on cultured fibroblasts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 54,

261-266 (1982).

- 8) Baldwin, D.Jr., Prince, M. Tsai, P., Johnson, C., Lotan, R., Rubenstein, A.H. and Olefsky, J.M.: Insulin binding, internalization, and receptor regulation in cultured human fibroblasts. Am. J. Physiol., 241, E251-E260 (1981).

Fig. 1. Werner症候群 (WS)、正常若年者 (NY) および老年者 (NO) の培養皮膚線維芽細胞のインスリン結合実験

(A) 細胞当り (10^5 cells) のmaximal ^{125}I -insulin binding

※ WS vs NY、NO $p < 0.001$

(B) 蛋白量当り (mg) のmaximal ^{125}I -insulin binding

(C) インスリン結合曲線から求めた ID_{50}

※※ WS vs NY、NO $p < 0.01$

Fig. 2. 正常若年者、正常老年者、およびワナー症候群患者より得た培養皮膚線維芽細胞への ^{125}I -インスリン結合曲線とそのScatchard解析 (挿入図)

(a) 細胞 10^6 個あたり (b) 蛋白量(mg)あたり

-○-○- : 正常若年者、-●-●- : 正常老年者、-△-△- : ワナー症候群

結果はmean \pm SEMであらわす

Fig. 3. 正常若年者から得た培養皮膚線維芽細胞でearly Passage (CPD < 25) とlate Passage (CPD > 25) の細胞のインスリン結合の比較

(A) 細胞当り (10^6 cells) のmaximal ^{125}I -insulin binding

(B) 蛋白量当り (mg) のmaximal ^{125}I -insulin binding

(C) ID_{50}

※ $p < 0.01$ 、※※ $p < 0.05$

Table 2. Growth Characteristics of Cultured Fibroblasts from Normal Subjects

	In Vitroにおける 細胞寿命 (CPD)	Senescent Phase の開始** (CPD)	実験時における Cell Density ($\times 10^6$ /dish)		実験時における蛋白量 ($\mu\text{g}/10^6$ cells)	
			Early Passage	Late Passage	Early Passage	Late Passage
若年者 (n = 4)	43.5 \pm 1.7	24.8 \pm 0.9	1.22 \pm 0.08	0.63** \pm 0.09	470 \pm 40	840* \pm 60
老年者 (n = 4)	41.8 \pm 2.8	24.8 \pm 0.6	1.01 \pm 0.07	0.56** \pm 0.06	490 \pm 40	830* \pm 60

* early passage vs late passage $p < 0.01$

** 1 : 8 にサブカルチャーした細胞が 1 週間以内に confluence に達しなくなった時を senescent phase の始まりとし、それ以前 early passage cells、以後を late passage cells とした。

Table 1. Growth Characteristics of Cultured Fibroblasts from Normal and Young Subjects and Patients with Werner's Syndrome

	In Vitroにおける 細胞寿命 (CPD)	実験時における	
		Cell Density ($\times 10^6$ /dish)	蛋白量 ($\mu\text{g}/10^6$ cells)
Werner 症候群 (n = 11)	14.5 \pm 1.3*	0.66 \pm 0.05*	700 \pm 40*
Control 若年者 (n = 7)	41.1 \pm 1.3	1.30 \pm 0.11	410 \pm 10
老年者 (n = 5)	37.6 \pm 1.2	1.28 \pm 0.10	420 \pm 20

* Werner's Synd vs Control $p < 0.001$

Fig. 1

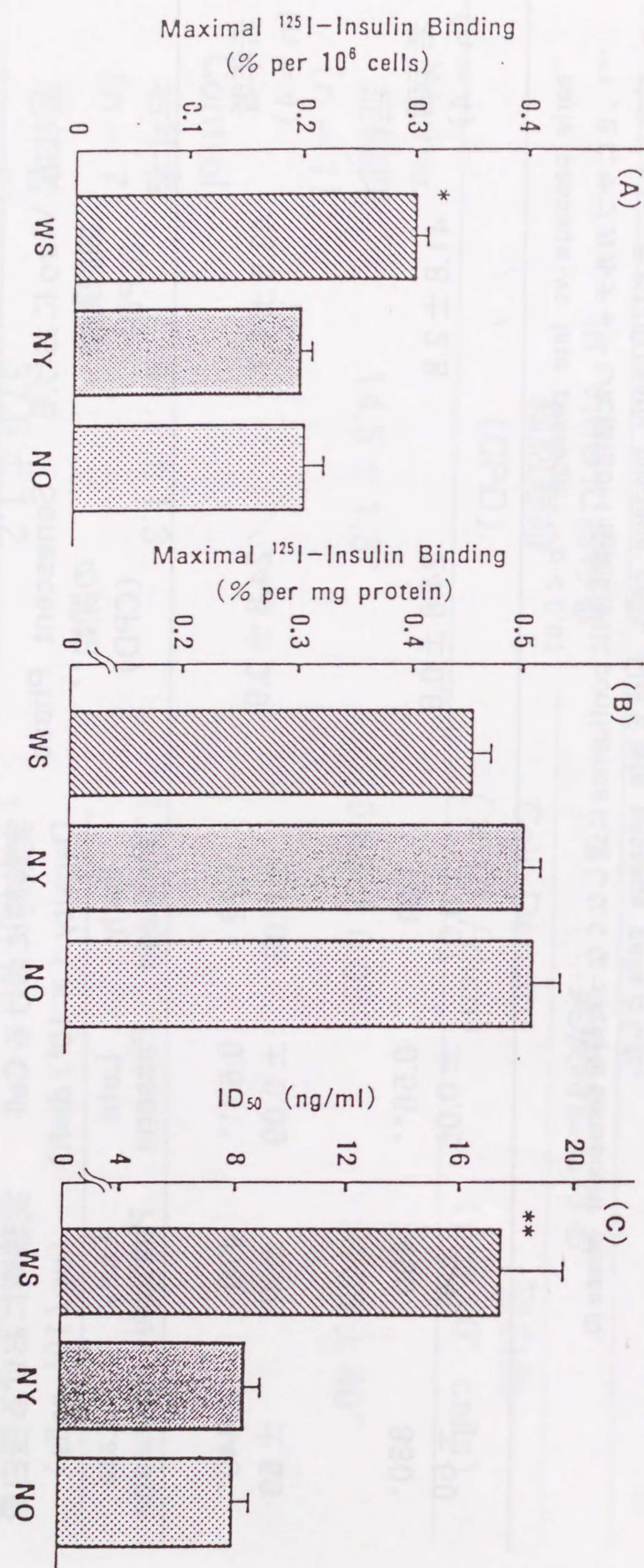


Fig. 2

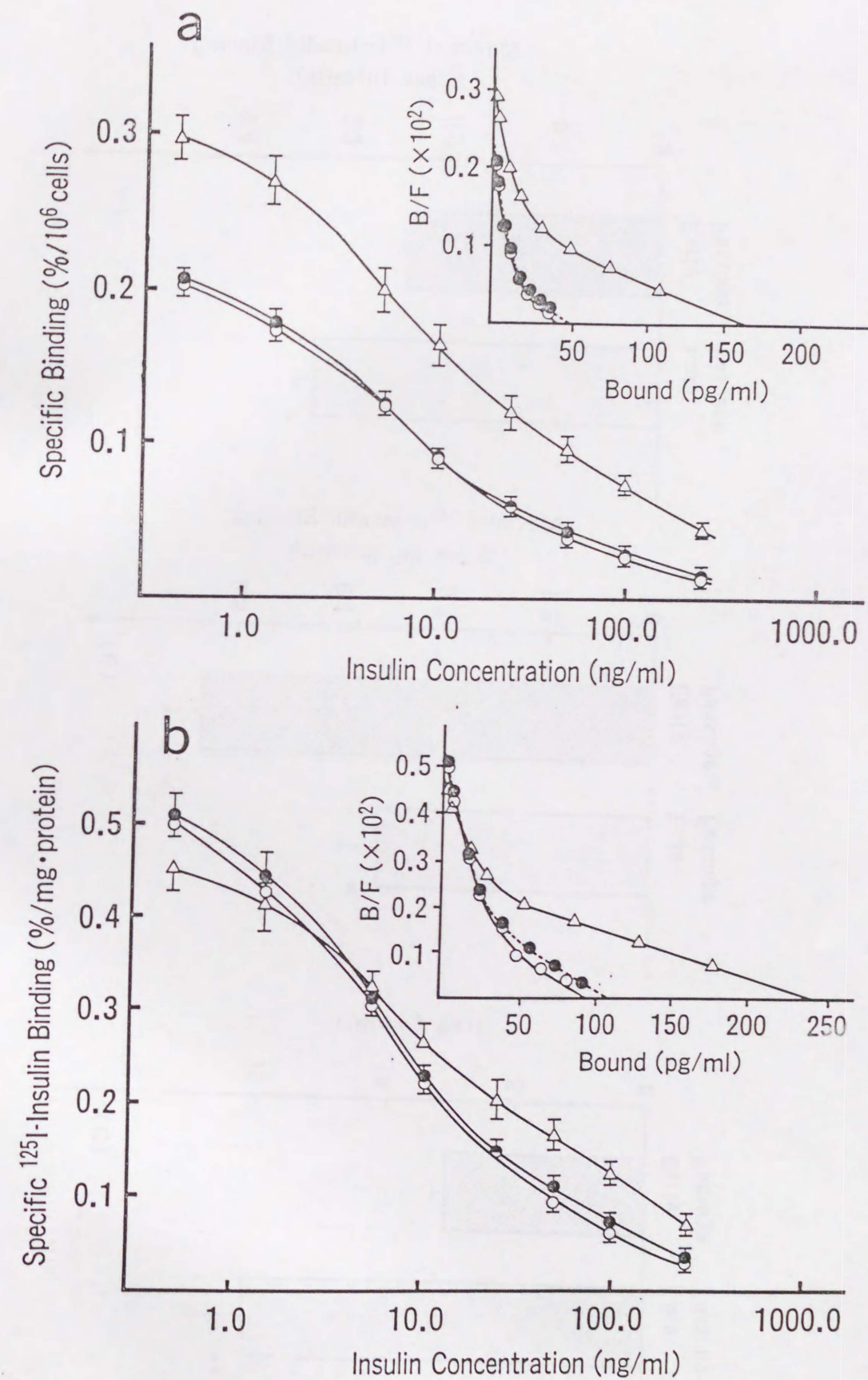
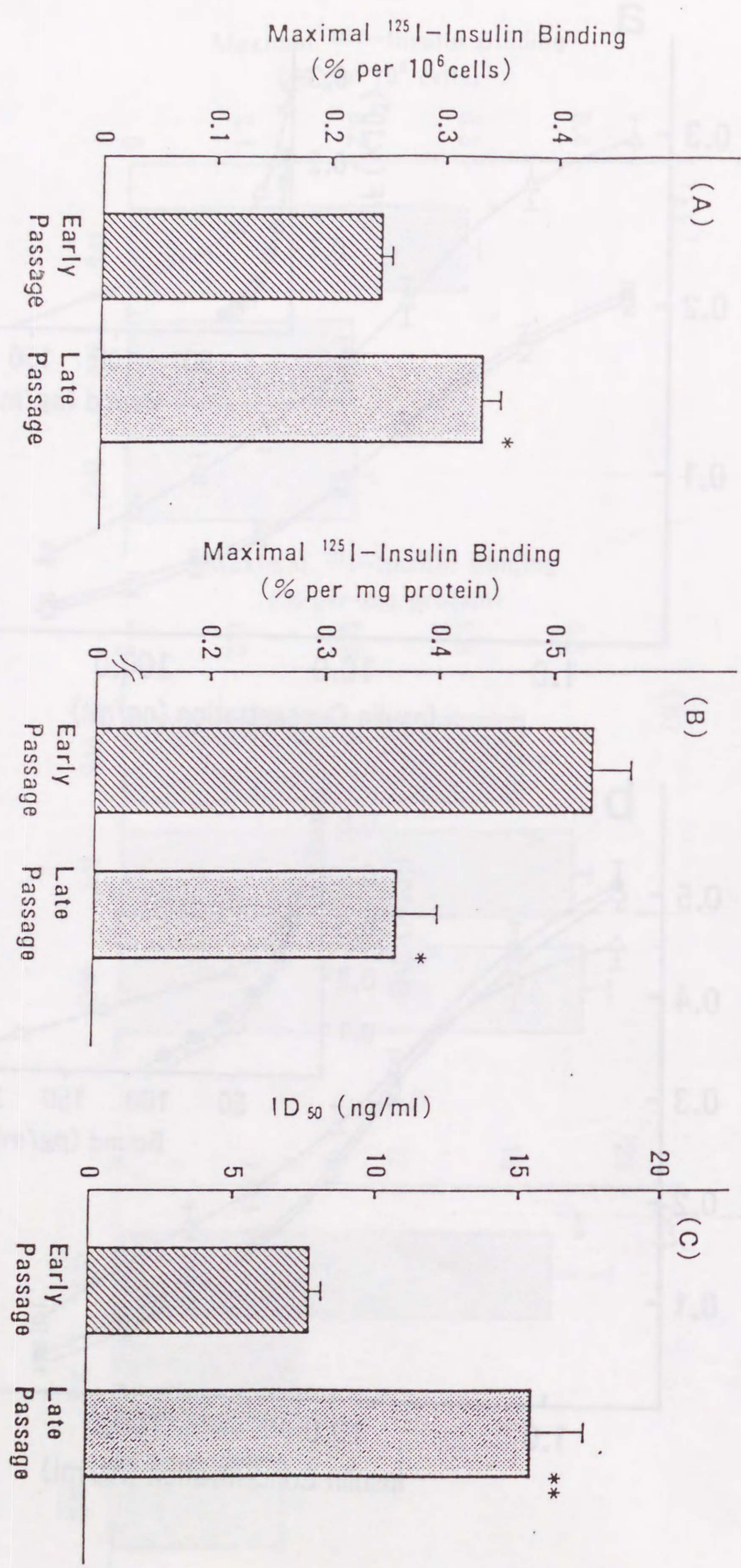


Fig. 3



Werner症候群におけるインスリン作用障害の研究

(2) 培養皮膚線維芽細胞のインスリン受容体

および受容体後の異常

京都大学医学部第2内科

山 田 和 範

葛 谷 英 嗣

井 村 裕 夫

別冊請求

京都市左京区聖護院川原町54

京都大学医学部第2内科

山 田 和 範

Studies on Insulin Resistance in Werner's Syndrome

(2) Receptor and Postreceptor Defects
of Insulin Actions in Cultured Fibroblasts

Kazunori Yamada, Hideshi Kuzuya, and Hiroo Imura

Second Department of Internal Medicine,
Faculty of Medicine, Kyoto University

Key Words: autophosphorylation of
insulin receptor
genetic defects of insulin action
glucose uptake
glucogen synthase
Werner's syndrome

抄 録

早期老化を特徴とする常染色体性劣性遺伝疾患のWerner症候群にはインスリン抵抗性を伴うことが報告されている。このインスリン抵抗性が、インスリン作用機構における何らかの原発性の異常に基くものであるか否かを明らかにするため、患者から得た培養皮膚線維芽細胞を用いてインスリン結合、インスリンによる ^{14}C -グルコースの取り込み及びglycogen synthase活性について検討した。Werner症候群患者と健常対照者からえた培養皮膚線維芽細胞では大きさが異なるため、結果は蛋白量当りで比較した。細胞へのインスリン結合はコントロールに比しWerner症候群で軽度低下しているにすぎず、また受容体の自己リン酸化能に異常はなかった。しかしインスリンによる ^{14}C -グルコースの取り込み、glycogen synthaseの活性化には著しい異常を認め、用量反応曲線は右方移動を示した。また、glycogen synthaseの活性化においては最大反応量の低下も認められた。

以上の結果から、Werner症候群の患者の培養皮膚線維芽細胞ではインスリン作用障害が存在していること、これは主としてインスリンの受容体後の何らかの異常 (post-receptor defect) に基くものであることが示唆された。

Summary

To determine if there is any primary defect which accounts for the insulin resistance in Werner's syndrome, we examined insulin actions using cultured skin fibroblasts obtained from patients with Werner's syndrome. Insulin binding to fibroblast monolayers (per mg protein) was only slightly decreased in Werner's syndrome compared with normal controls. When normalized to the degree of insulin binding, no difference was found in the magnitude of basal and insulin-stimulated autophosphorylation of wheat-germ-agglutinin-purified insulin receptors between the control and Werner's syndrome. Dose-response curves of insulin-stimulated ^{14}C -glucose uptake and glycogen synthase activity exhibited a pronounced right-shift in Werner's syndrome with a decrease in the maximal responses in the latter. These results suggest that insulin action is impaired in Werner's syndrome fibroblasts mainly due to defects in the step distal to the insulin receptor.

はじめに

Werner症候群は早期老化を特徴とする常染色体性劣性遺伝疾患で、高率に糖尿病ないし耐糖能低下を伴うことが報告されている^{1)~3)}。我々は以前グルコースクランプ法を用いて、Werner症候群の患者ではインスリンに対する感受性 (sensitivity) の低下があり、これが糖代謝異常の主因となっていることを示した⁴⁾。しかしその機序についてはまだ明らかとなっていない。

インスリンは標的細胞で、先ず、細胞膜に存在するインスリン受容体の α サブユニットと結合する。その結果、受容体 β サブユニットに存在するチロシンキナーゼが活性化され β サブユニットの自己燐酸化 (autophosphorylation) が起こる⁵⁾⁶⁾。活性化されたチロシンキナーゼによりインスリンのシグナルは細胞内へ伝達され、細胞内ではさらにいくつかのステップを経てインスリン作用が発現されと考えられている。そこで我々はWerner症候群におけるインスリン作用障害がインスリン作用機構のいかなる異常に基づくかを明らかにするため、患者の培養皮膚線維芽細胞を用いてインスリン受容体の検索を行なった。また、受容体後の異常の有無をみるため、インスリンによる ^{14}C -グルコースの取り込み、glycogen synthaseの活性化についての検討も加えた。培養皮膚線維芽細胞は、インスリン作用に影響を及ぼすと考えられている種々の体内環境因子を取り除いた状態で、受容体や受容体以降の異常を検討できることから、遺伝的なインスリン作用障害の検索に、しばしば用いられている。

対象と方法

Werner症候群 (WS) の患者8名 (男性4名、女性4名、年齢25~51歳) よりえた培養皮膚線維芽細胞を用いた。Werner症候群の診断は白髪・禿頭などの早老性顔貌、白内障、皮膚の萎縮や硬化など特徴的な臨床症状に基いた。1名では耐糖能異常もなく高インスリン血症もみられなかったが他の7例では糖尿病 (早朝空腹時血糖値、131~239mg/dl) を有するか、あるいはブドウ糖負荷試験の際、高インスリン血症を認めた。対照は12名の健康人で、これらは年齢により若年者群 (NY、n=7、年齢 31 ± 1 歳) と老年者群 (NO、n=5、年

齢 76 ± 2 歳)に分けた。

培養皮膚線維芽細胞：前腕部よりバイオブシーによってえた皮膚切片を培養に用いた。Werner症候群の線維芽細胞のin vitroにおけるlife spanはコントロール群に比し著しく短縮していた(WS; 16 ± 1 、NY; 45 ± 1 、NO; 42 ± 2 cell population doubling、CPD)。実験には8~20CPDの細胞を用いた。

インスリン結合： ^{125}I -インスリンの培養皮膚線維芽細胞への結合は単層培養のままBaldwinらの方法⁷⁷⁾に準じて行った。16×15mmのculture dishを用いて細胞がconfluenceに達したのち、 ^{125}I -インスリン(0.5ng/ml)及び種々の濃度(0~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)の非標識インスリンと16°Cで3時間インキュベートした。緩衝液には25mM HEPES、25mM Tricine、1% BSAを含む α -MEMを用いた(pH 7.4)。その後、細胞を緩衝液で洗浄し、1N NaOHで可溶化してその放射活性を γ カウンターにて測定した。Werner症候群とコントロールでは細胞の大きさが異なるので、結果は蛋白量当りであらわした。

^{14}C -グルコースの取り込み：線維芽細胞へのブドウ糖取り込みはHowardらの方法⁸⁰⁾に準じた。すなわち、60×15mmのplastic dishで細胞がconfluenceに達して1~2日後、21mM NaHCO_3 と0.1% BSAを添加した5mlのincubation buffer(0.14M NaCl、2.7mM KCl、0.9mM CaCl_2 、1.47mM KH_2PO_4 、8.06mM Na_2HPO_4 、0.49mM MgCl_2 、2mM glutamine、BME amino acids、BME vitamins)で細胞を37°C24時間インキュベートした。次いで、種々の濃度のインスリンと37°Cで2時間インキュベート後、D-U- ^{14}C -グルコース(1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 、0.5mM)を添加し、20分間に細胞内へ取り込まれた ^{14}C -グルコースを液体シンチレーションカウンターにて測定した。実験はtriplicateで行い結果は蛋白量当りであらわした。

Glycogen Synthase 活性：100mm plastic dishにて細胞がconfluenceに達して1~2日後、21mM NaHCO_3 、0.1%BSAを添加した上記incubation buffer中で、種々の濃度のインスリンとともに細胞を37°C2時間インキュベートした。その後細胞を冷却したNaF-EDTA(100mM NaF、10mM EDTA、pH7.0)で洗浄し、試験管に移し、500×gで5分遠沈した。ペレットを0.5mlのNaF-EDTA 中でポリトロンホモジナイザーを用いてホモジナイズし、ベックマンモデルB遠心器で2分遠心(10,000rpm)した。えられた上清を用いてThomasらの方法⁹⁰⁾によりglycogen synthase活性を測定した。glycogen synthase非依存性活性の測定には、サンプル(30 μl)を10mM Tris-HCl(pH7.8)、20mM EDTA、25 mM NaF、10mg/ml glycogen、6.7mM uridine diphosphate D-U- ^{14}C -グルコースを含む溶液60 μl とともに

30°Cで20時間インキュベートした。総活性の測定には上記混合物の中に、さらに11mM glucose-6-phosphateを加えて行った。glycogen synthase非依存性活性は総synthase活性の%としてあらわした(%I活性、この系ではインスリン作用は%I活性の増加としてあらわれる)。

培養線維芽細胞よりインスリン受容体の精製：細胞を1% Triton X-100、2mM PMSF、0.1mg/ml aprotininを含む50mM Tris-HCl 緩衝液(pH7.6)で可溶化した(4°C、60分)。これを120,000×gで遠心し(4°C、45分)、上清をwheat-germ-agglutinin(WGA)-sepharose(1.5ml)カラムにアプライした。カラムを洗浄後、0.3M N-acetyl-D-glucosamine、150mM NaCl、2mM MgCl_2 、2mM PMSF、0.1% Triton X-100を含む50mM Tris-HCl緩衝液(pH7.6)で溶出し、インスリン受容体を得た。WGA 精製インスリン受容体の一部は以下の如く ^{125}I -インスリン結合実験に、一部は自己リン酸化の実験に用いた。

WGA 精製インスリン受容体へのインスリン結合：WGA 精製インスリン受容体(蛋白量15~30 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$)を0.1% BSA、0.1% Triton X-100 を含む50mM Tris-HCl 緩衝液(pH7.6)中で ^{125}I -インスリン(0.6ng/ml)及び非標識インスリン(0~6,000ng/ml)と4°Cで18時間インキュベートした。受容体に結合した ^{125}I -インスリンは牛 γ グロブリンと12.5% polyethylene glycol の添加によって沈殿させ、沈殿物の放射活性を γ カウンターによって測定した。

WGA 精製インスリン受容体の自己リン酸化：WGA 精製インスリン受容体(蛋白量として30~60 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を種々の濃度(0~6,000ng/ml)のインスリンと4°Cで18時間プレインキュベートした。これに10mM NaF、4mM MnCl_2 、50 μM [γ - ^{32}P]ATPを加えて、22°Cで15分間反応させた。その後、10mM NaF、5mM EDTA、5mM ATP を含む溶液で反応を止め、混合物より抗インスリン受容体抗体と10% pansorbin(w/v)を用いてインスリン受容体の免疫沈降を行った。沈殿物を0.1M DTTを含むLaemmli bufferで5分間煮沸し、10,000×g で4分間遠心した。上清のSDS(7.5%)ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった。リン酸化されたインスリン受容体の β サブユニットは、オートラジオグラフィーにより95kDaバンドとして検出した。この部分をゲルより切り取り、液体シンチレーションカウンターによって放射活性を測定した。

その他： ^{125}I -インスリン(比活性100~200 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)はchloramin T法により作製した。蛋白定量はBSA をスタンダードとして、Bio-Rad 蛋白アッセイキットを用いて行った。全

てのデータはmean±SEであらわし、Student's *t* testを用いて有意差検定をした。

結 果

培養皮膚線維芽細胞への¹²⁵I-インスリン結合：¹²⁵I-インスリン (0.5 ng/ml) の培養皮膚線維芽細胞への結合 (maximal insulin binding) は正常若年者 (NY) と老年者 (NO) の間に差を認めなかった (0.54±0.05 vs 0.49±0.06%)。一方、Werner症候群 (WS) からえた細胞では単位蛋白量あたりでは0.43±0.02%と軽度ながら低下しており、若年者の細胞との間に有意差を認めた (*p*<0.05)。インスリン結合曲線で最大結合を50% 抑制するインスリン濃度 (ID₅₀) は、正常若年者7.5±1.0 ng/ml、老齡者8.4±1.0 ng/mlに比し、Werner症候群では著しく増加 (19.6±3.0 ng/ml; WS vs NY; *p*<0.005、WS vs NO; *p*<0.025) しており、インスリン受容体の結合親和性の低下が示唆された (Fig. 1)。

培養皮膚線維芽細胞へのブドウ糖とりこみ：正常細胞では、インスリンによって細胞への¹⁴C-グルコースの取り込みは用量依存性に増加し、インスリン濃度5,000 ng/ml でほぼ頂値に達した。最大反応量の50%に達するインスリン濃度 (ED₅₀) は60ng/mlであった (Fig. 2)。正常若年者と老年者から得た細胞では、基礎状態の取り込み (インスリン無添加における取り込み: NY;16.1±2.1, NO;16.3±1.4 n mole/mg protein/20 min) もインスリンによる最大反応量maximal stimulation (最大の取り込みから基礎状態の取り込みをひいたもの: NY;8.8±1.3、NO;8.1± 1.1 n mole/mg protein/20 min) とともに差は認めなかった。また用量反応曲線のED₅₀ (最大刺激の50%を与えるインスリン濃度) も両群で差はなかった (NY=49±13、NO;61±13ng/ml)。一方Werner症候群の細胞では細胞系統による差が大きかったが、全体としてみると基礎状態の取り込み (17.5±1.4 n mole/mg/20 min)、最大反応量 (6.9±1.5 n mole/mg/20 min) は正常コントロール群と変わらなかった。しかし用量反応曲線は右方移動しED₅₀は有意に高値を示した (421±110ng/ml、WS vs NY、NO *p*<0.025) (Fig. 2)。

Glycogen Synthase 活性：正常者からの細胞ではインスリンによりglycogen synthase 活性は用量依存性に増加し、インスリン濃度1,000ng/mlで最大反応を示した。若年者と老年者における基礎状態の%I活性 (インスリン無添加時の%I活性)、インスリンによる最大

反応 (最大%I活性から基礎状態%I活性をひいたもの)、ED₅₀とも差は認めなかった (それぞれ基礎状態:15.3±2.7 vs 13.3±3.8%、インスリンによる最大刺激: 30.2±5.2 vs 21.5±3.1%、ED₅₀:19±4 vs 29±11ng/ml) (Fig. 3)。Werner症候群の細胞では全体としてみると、%I活性は基礎状態においても (6.0±1.2%; WS vs NY *p*<0.005、WS vs NO *p*<0.05)、インスリンによる最大刺激においても (8.4±2.2%、WS vs NY、NO *p*<0.005) コントロールに比し低下していた。また用量反応曲線から求めたED₅₀は増加しており (274±73ng/ml、WS vs NY *p*<0.025、WS vs NO *p*<0.05)、用量反応曲線の右方移動が示された (Fig. 3)。

一方glycogen synthase の総活性はインスリン無添加においても、1,000ng/mlのインスリン添加した状態においても、これら3群で差はなかった。

WGA部分精製したインスリン受容体への¹²⁵I-インスリンの結合：インスリン結合曲線は、正常若年者、老年者、Werner症候群の3群とも差を認めなかった。すなわち、¹²⁵I-インスリン0.6ng/mlにおけるインスリン結合 (% per 20 μg protein) はそれぞれ6.9±0.9、8.4±1.6、7.5±1.0%、ID₅₀ (ng/ml) は4.0、2.8、3.5ng/mlであった。

WGA部分精製インスリン受容体の自己リン酸化：リン酸化されたインスリン受容体βサブユニットはオートラジオグラフィーにより単一のバンド (95kDa) として検出された。βサブユニットのリン酸化はインスリンによって用量依存性に増加し600ng/ml (10⁻⁷M) のインスリンで最大反応を示した (Fig. 4)。正常若年者、老年者のWGA分画において600 ng/ml (10⁻⁷M) のインスリン刺激下の 95kDaバンドへの³²Pのとりこみは基礎状態よりそれぞれ、8.8±1.2倍、7.9±1.7倍増加し、最大反応の50%に達するインスリン濃度 (ED₅₀) は、それぞれ36±11ng/ml、25±7ng/mlであった。このように正常若年者と老齡者の間に、インスリン受容体βサブユニットの自己リン酸化に差はなかった。Werner症候群患者の細胞から精製したインスリン受容体でも最大反応 (7.7±0.8倍)、ED₅₀ (31.1±4.8ng/ml) とともに正常コントロール群と変わらなかった。95kDa蛋白のリン酸化の程度を、インスリン受容体に結合したインスリンあたりであらわした場合でも、3群の細胞において 95kDaのリン酸化に差はなかった。

考 察

Werner症候群は早期老化を特徴とする疾患である。従って、先ず、健康人より得た線維芽細胞を用いて、ドナーの年齢とインスリン作用の関係について検討した。その結果、インスリン結合、無細胞系でみたインスリン受容体の自己リン酸化、インスリンによる細胞内への ^{14}C -グルコースの取り込み、glycogen synthaseの活性化のいずれにおいても、若年者と老年者からの細胞の間に差を認めなかった。以前より加齢に伴いインスリン作用障害がおこることが知られているが、培養線維芽細胞を用いたin vitroの系ではこの点は観察しえなかった。

一方、Werner症候群の患者の細胞では、インスリンによるブドウ糖の取り込み、glycogen synthaseの活性化に異常が認められ、インスリン作用障害の存在が明らかであった。細胞へのインスリン結合は、蛋白量当りであらわすと大部分の細胞で軽度に低下しているにすぎなかった。WGAで部分精製したインスリン受容体を用いて無細胞系で測定したインスリン受容体の自己リン酸化はコントロール群の細胞と差を認めなかった。以上の結果より、線維芽細胞でのインスリン作用障害は受容体レベルというより、主として受容体後のレベルの何らかの異常によることが示唆された。Werner症候群の患者の細胞では、インスリン結合曲線の ID_{50} が大で、受容体の結合親和性の低下が示唆されたが、細胞をTriton X-100で可溶化し、WGAにより部分精製した受容体では、このような親和性の低下は見られなかった。従って細胞をそのまま用いてインスリン結合を調べた時にみられた結合親和性の低下は受容体分子そのものの異常に基づくと考えより、受容体を取りまく細胞膜ないしは細胞骨格の何らかの変化に基づく二次的なものと考える方が妥当であると思われる。

上に述べたようにWerner症候群の細胞では全体としてみると、 ^{14}C -グルコースの取り込み、glycogen synthase活性化のインスリン用量反応関係に異常が認められた。 ^{14}C -グルコースの取り込みではインスリンによってえられる最大刺激はコントロール群と変わらなかったが、用量反応関係は右方移動し、 ED_{50} は高値を示した(sensitivityの低下)。一方、glycogen synthase活性(%I活性)はインスリン無添加においても低下しており、インスリンによってえられる最大刺激も低下していた(responsivenessの低下)。また容量反応関係の右方移動もみられた。しかし個々の例についてみると異常の程度やそのパターンは様々であった。たとえばインスリンによるglycogen synthaseの活性化においても、

4例では最大反応は著減し、用量反応曲線の右方移動も認められたが、2例では最大刺激も ED_{50} もほぼ正常範囲であった。また、 ^{14}C -グルコースの取り込みの成績とglycogen synthase活性の成績はかならずしも平行していなかった。glycogen synthaseの活性化に関して正常を示した細胞のうちのひとつは、 ^{14}C -グルコースの取り込みでは異常を示した。このように、Werner症候群の培養線維芽細胞のインスリン作用の異常は多様であるといえる。

以上のようなインスリン作用障害が、培養線維芽細胞においてみとめられるという事実は、Werner症候群患者にみられるインスリン抵抗症が、原発性のものである可能性を強く示唆するものである。一方、Werner症候群患者由来の細胞は、継代培養中に、転座を中心とする染色体異常を生じることが報告されており^{10), 11)}、これが培養細胞レベルでみられるインスリン作用障害をひきおこす可能性は否定しきれない。今後、Werner症候群患者にみられるインスリン抵抗症を解明する為には、以上のような培養細胞を用いての検索とともに、脂肪や筋肉組織などインスリン標的組織を用いて、生体レベルでの検索を行い、両者を比較検討することが必要である。

→ Result + ...
 49 - 1000
 Best

文 献

- 1) Thannhauser, S.J.: Werner's syndrome (progeria of the adult) and Rothmund's syndrome: Two types of closely related heredofamilial atrophic dermatoses with juvenile cataracts and endocrine features; A critical study with five new cases. *Ann. Intern. Med.*, 23, 559-626 (1945).
- 2) Epstein, C.J., Martin, G.M., Schultz, A.L. and Motulsky, A.G.: Werner's syndrome. A review of its symptomatology, natural history, pathologic features, genetics and relationship to the natural aging process. *Medicine*, 45, 177-221 (1966).
- 3) Imura, H., Nakao, Y., Kuzuya, H., Okamoto, M., Okamoto, M. and Yamada, K.: Clinical, endocrine and metabolic aspects of the Werner syndrome compared with those of normal aging. *Werner's Syndrome and Human Aging*, ed by Salk, D. et al. Plenum Publishing Co. (1985).
- 4) Okamoto, M., Okamoto, M., Yamada, K., Yoshimasa, Y., Kosaki, A., Kono, S., Inoue, G., Maeda, I., Kubota, M., Hayashi, T., Kato, S., Kuzuya, H., and Imura, H.: Insulin resistance in Werner's syndrome. *Mech. Ageing Dev.*, in press.
- 5) Kasuga, M., Karlsson, F.A. and Kahn, C.R.: Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. *Science*, 215, 185-187 (1982).

- 6) Kasuga, M., Yamaguchi, Y.F., Blithe, D.L. and Kahn, C.R.: Tyrosine specific protein kinase activity is associated with the purified insulin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 2137-2141 (1983).
- 7) Baldwin, D.Jr., Prince, M., Tsai, P., Johnson, C., Lotan, R., Rubenstein, A.H. and Olefsky, J.M.: Insulin binding, internalization, and receptor regulation in cultured human fibroblasts. *Am. J. Physiol.*, 241, E251-E260 (1981).
- 8) Howard, B.V., Mott, D.M., Fields, R.M. and Bennett, P.H.: Insulin stimulation of glucose entry in cultured human fibroblasts. *J. Cell. Physiol.*, 101, 129-138 (1979).
- 9) Thomas, J.A., Schlender, K.K. and Lerner, J.: A rapid filter paper assay for UDP glucose-glycogen glucosyltransferase, including an improved biosynthesis of UDP-¹⁴C-glucose. *Anal. Biochem.*, 25, 480-499 (1968).
- 10) Salk, D., Au, K., Hoehn, H and Martin, G.M.: Cytogenetics of Werner's syndrome cultured skin fibroblasts: variegated translocation mosaicism. *Cytogenet. Cell Genet.*, 30, 92-107 (1981).
- 11) Scappaticci, S., Cerimele, D. and Fraccaro, M.: Clonal structural chromosomal rearrangements in primary fibroblast cultures and in lymphocytes of patients with Werner's syndrome. *Hum. Genet.*, 62, 16-24 (1982).

Fig. 1: 正常若年者 (NY)、老年者 (NO)、Werner症候群 (WS) の培養皮膚線維芽細胞に

おけるinsulin binding study

(A) Maximal ^{125}I -Insulin Binding

(非標識インスリン無添加におけるインスリン結合)

※ WS vs NY、NO; $p < 0.05$

(B) ID_{50}

※ WS vs NY; $p < 0.005$

WS vs NO; $p < 0.025$

Fig. 2: 正常若年者 (NY)、老年者 (NO)、Werner症候群 (WS) の培養皮膚線維芽細胞に

おける ^{14}C -グルコースの取り込み

(A) インスリンによって得られるmaximal stimulation

(B) ED_{50}

※ WS vs NY、NO; $p < 0.025$

Fig. 3: 正常若年者 (NY)、老年者 (NO)、Werner症候群 (WS) の培養皮膚線維芽細胞に

おけるglycogen synthase活性 (%I活性)

(A) インスリンによって得られるmaximal stimulation

※ WS vs NY、NO; $p < 0.005$

(B) ED_{50}

※ WS vs NY; $p < 0.025$

WS vs NO; $p < 0.05$

Fig. 4: WGA-精製インスリン受容体 β サブユニット (95K) の自己リン酸化

(a) 正常若年者、(b) 老年者、(c) Werner症候群患者。それぞれ代表例のオートラジオグ

ラムを示す。

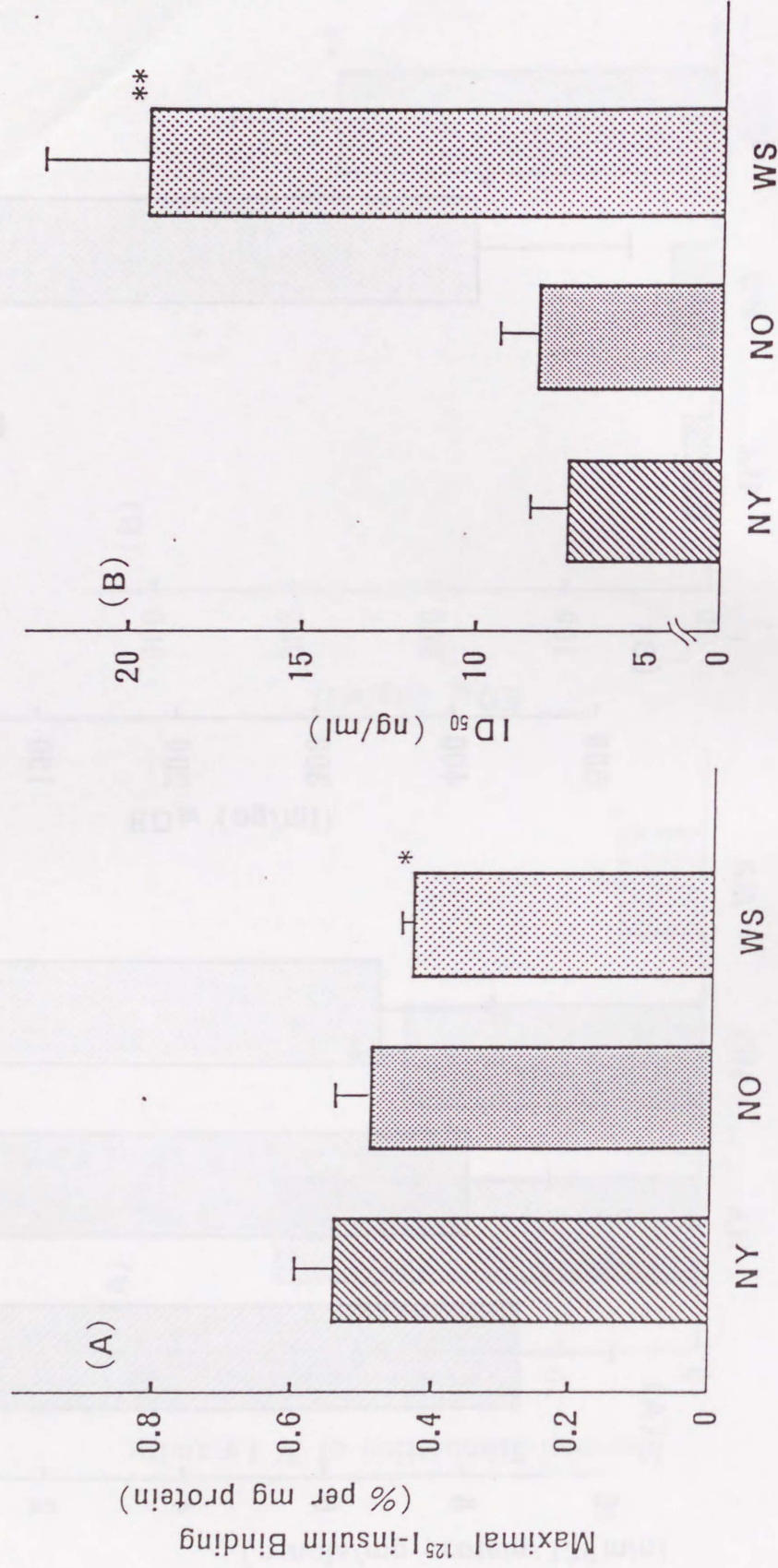


Fig. 1

Fig. 2

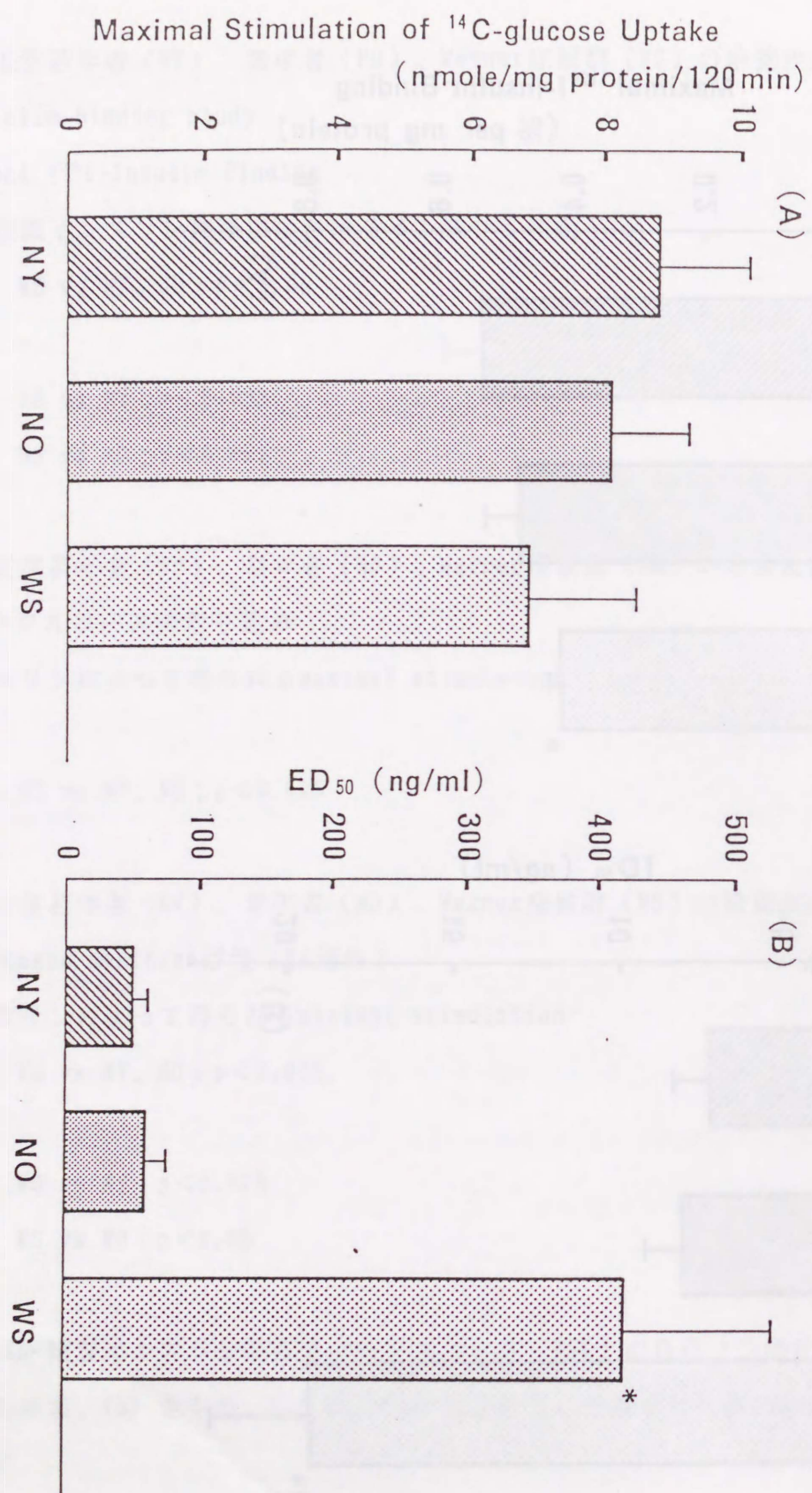


Fig. 3

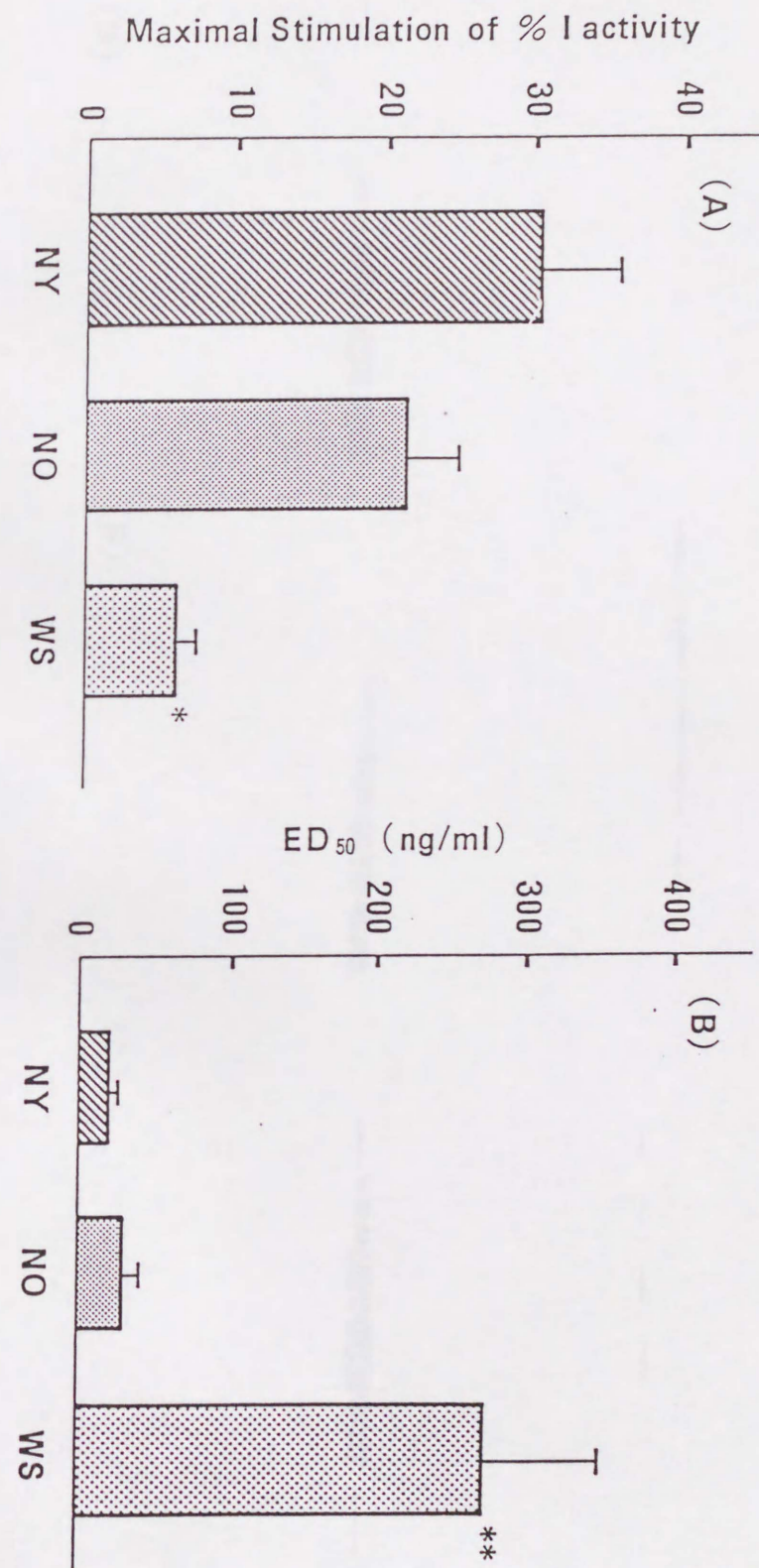


Fig. 4

